

⑬ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift  
⑪ DE 3240177 A1

⑤ Int. Cl. 3:  
A61K37/26  
A61K31/68  
C07C103/52

⑲ Aktenzeichen:  
⑳ Anmeldetag:  
㉑ Offenlegungstag:

P 32 40 177.9  
29. 10. 82  
11. 5. 83

③④ Unionspriorität: ③② ③③ ③①

30.10.81 DK 4786

20.07.82 DK 3247

⑦① Anmelder:

Novo Industri A/S, 2880 Bagsvaerd, DK

⑦② Erfinder:

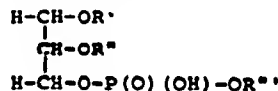
Hansen, Philip Edgar, 2100 Copenhagen, DK; Brange, Jens  
Joergen Vejlgard, 2930 Klampenborg, DK; Havelund,  
Svend, 2850 Hvidovre, DK

⑦④ Vertreter:

Boehmert, A., Dipl.-Ing.; Hoormann, W., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.;  
Goddar, H., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., 2800 Bremen;  
Neidl-Stippler, C., Dipl.-Chem. Dr.phil.nat., Pat.-Anw., 8000  
München; Stahlberg, W.; Kuntze, W., Rechtsanw., 2800  
Bremen

⑤④ Stabilisierte Insulinpräparate und Verfahren zur Herstellung derselben

Insulinlösungen können physikalisch stabilisiert werden,  
indem ihnen Phospholipide der Formel



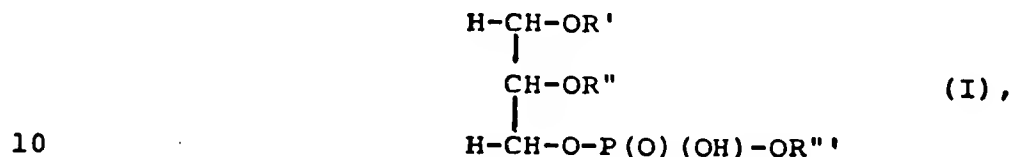
mit R', R'' und R''' gemäß vorangehenden Patentansprüchen,  
bevorzugterweise semisynthetisches Lecithin, zugesetzt wer-  
den. (32 40 177)

DE 3240177 A1

DE 3240177 A1

# Patentansprüche

1. Physikalisch stabilisierte Insulinlösung, die gegebenenfalls Zink, ein Konservierungsmittel, einen Zusatz, um die Lösung isotonisch zu machen und eine Puffersubstanz enthält, dadurch gekennzeichnet, dass sie stabilisierende Mengen an einem Phospholipid der Formel (I) enthält



in der R' und R'', die gleich oder verschieden sein können, stehen für Wasserstoff, Alkylcarbonyl, Alkenylcarbonyl, Alkadienylcarbonyl, Alkatrienylcarbonyl oder Alkatetraenylcarbonyl, mit der Massgabe, dass R' und R'' nie gleichzeitig Wasserstoff sind, und in der R''' für eine hydrophile Gruppe steht.

2. Insulinlösung gemäss Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die hydrophile Gruppe in der Formel (I) 2-(Trimethylammonium)äthyl, 2-Aminoäthyl, 2-Carboxy-2-aminoäthyl, 2,3-Dihydroxypropyl oder 2,3,4,5,6-Pentahydroxycyclohexyl ist.

3. Insulinlösung gemäss Patentanspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Insulin im wesentlichen ausserhalb von allen Liposomen vorliegt.
- 5      4. Insulinlösung gemäss irgendeinem der vorangehenden Patentansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass R' und/oder R" als Alkylcarbonyl, Alkenylcarbonyl, Alkadienylcarbonyl, Alkatrienylcarbonyl und Alkatetraenylcarbonyl-Gruppen vorliegen,  
10      welche von etwa 8 bis etwa 22 C-Atomen enthalten.
5. Insulinlösung gemäss Patentanspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die genannten Gruppen von etwa 12 bis etwa 22 C-Atome enthalten.
- 15      6. Insulinlösung gemäss irgendeinem der vorangehenden Patentansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass R' und R" je für Alkylcarbonyl stehen.
- 20      7. Insulinlösung gemäss irgendeinem der vorangehenden Patentansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass R"' für 2-(Trimethylammonium)äthyl steht.
8. Insulinlösung gemäss Patentanspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass R' und R" je für Alkylcarbonyl stehen mit je von etwa 8 bis etwa 16 C-Atomen.
- 25      9. Insulinlösung gemäss Patentanspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass R' und R" je für Alkylcarbonyl stehen mit von etwa 12 bis etwa 16 C-Atomen.

10. Insulinlösung gemäss irgendeinem der vorangehenden Patentansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> je für Octanoyl stehen.
- 5 11. Insulinlösung gemäss irgendeinem der vorangehenden Patentansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration des Phospholipids der Formel (I) in der Lösung im Bereich von ungefähr 10 bis ungefähr 200 µg/ml liegt.
- 10 12. Insulinlösung gemäss Patentanspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration an Phospholipid zwischen etwa 10 und etwa 100 µg/ml liegt.
- 15 13. Insulinlösung gemäss Patentanspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration an Phospholipid zwischen etwa 25 und etwa 75 µg/ml liegt.
- 20 14. Insulinlösung gemäss Patentanspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration zwischen etwa 30 und etwa 50 µg/ml liegt.
- 25 15. Insulinlösung gemäss irgendeinem der vorangehenden Patentansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Gewichtsverhältnis zwischen dem Phospholipid der Formel (I) und dem Insulin im Bereich zwischen ungefähr 1:5 bis ungefähr 1:10'000 liegt.

16. Insulinlösung gemäss Patentanspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass das genannte Gewichtsverhältnis im Bereich von etwa 1:10 bis etwa 1:1'000 liegt.
- 5 17. Insulinlösung gemäss irgendeinem der vorangehenden Patentansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass sie zusätzlich Zink enthält.
- 10 18. Insulinlösung gemäss Patentanspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Verhältnis zwischen der molaren Konzentration an Zinkionen, das dem Insulin zur Verfügung steht, und der molaren Konzentration von Insulin, berechnet als Insulin-Hexameres, im Bereich von etwa 1,5 bis etwa 4,6 liegt.
- 15 19. Insulinlösung gemäss Patentanspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass das genannte Verhältnis im Bereich von etwa 3 bis etwa 4,5 liegt.
- 20 20. Insulinlösung gemäss Patentanspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass das genannte Verhältnis im Bereich von etwa 3,6 bis etwa 4,3 liegt.
- 25 21. Verfahren zur Herstellung einer Insulinlösung gemäss irgendeinem der vorangehenden Patentansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Insulin mit einer Verbindung der Formel (I) gemäss Patentanspruch 1 gemischt wird, wobei ggf. zusätzlich ein Zinksalz, ein Konservierungs-

29.10.82

3240177

- 5 -

mittel, ein Zusatz, um die Lösung isotonisch zu machen und eine Puffer-substanz in Anwesenheit von Wasser, zugegeben werden können.

- 5 22. Verfahren gemäss Patentanspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Mischung einer Ultraschallbehandlung unterworfen wird, bevor das Insulin zugegeben wird.
- 10 23. Verfahren zur Stabilisierung einer Insulinlösung, welche gegebenenfalls ein Konservierungsmittel, einen Zusatz, um die Lösung isotonisch zu machen und eine Puffersubstanz enthält, dadurch gekennzeichnet, dass dazu ein Phospholipid der Formel (I) gemäss Patentanspruch 1, bevorzugterweise in einer wässrigen Lösung,
- 15 welche, falls gewünscht, einer Ultraschallbehandlung unterzogen worden ist, gegeben wird.
24. Insulinlösung gemäss den Beispielen 1 bis 22.

29.10.82

3240177

# BOEHMERT & BOEHMERT

ANWALTSSOZIENTÄT

Boehmert &amp; Boehmert, Postfach/P. O. Box 107127, D-2800 Bremen 1, ...

Deutsches Patentamt  
Zweibrückenstraße 12  
8000 München 2

PATENTANWALT DR.-ING. KARL BOEHMERT (1933-1973)  
PATENTANWALT DIPL.-ING. ALBERT BOEHMERT, BREMEN  
RECHTSANWALT WILHELM J. H. STAHLBERG, BREMEN  
PATENTANWALT DR.-ING. WALTER HOORMANN, BREMEN  
PATENTANWALT DIPL.-PHYS. DR. HEINZ GODDAR, BREMEN  
PATENTANWALT DIPL.-ING. EDMUND P. EITNER, MÜNCHEN  
RECHTSANWALT WOLF-DIETER KUNTZE, BREMEN  
RECHTSANWALT DIPL.-ING. JAN G. TÖNNIES, BREMEN  
PATENTANWALT DIPL.-CHEM. DR. CORNELIA NEIDL, MÜNCHEN

Ihr Zeichen  
Your ref.

Ihr Schreiben vom  
Your letter of

Unser Zeichen  
Our ref.

Bremen,  
Hollerallee 32

Neuanmeldung  
(Pat.)

NXM 810

29. Oktober 1982

Novo Industri A/S, Novo Allé, DK-2880 Bagsvaerd, Dänemark

-----  
Stabilisierte Insulinpräparate und Verfahren zur Herstellung derselben  
-----

Die vorliegende Erfindung betrifft eine physikalisch stabilisierte Insulinlösung, ein Verfahren zur Herstellung einer Insulinlösung, ein Verfahren zur Stabilisierung einer Insulinlösung, welche ggf. ein Konservierungsmittel, einen Zusatz, um die Lösung isotonisch zu machen u. eine Puffersubstanz enthält sowie eine Insulinlösung.

Insulin, das in einem flüssigen Medium, beispielsweise Wasser, gelöst ist, kann bei Raumtemperatur jahrelang gelagert werden. Die genannten Präparate sind in der genannten Zeitperiode also stabil. Wenn aber eine Insulinlösung auf etwa 80°C erwärmt wird, wird das Insulin innerhalb weniger Minuten denaturiert, ein Vorgang, welcher als Wärmedenaturierung oder Wärmepolymerisation bezeichnet wird. Wenn eine Insulinlösung einige Tage lang bei tieferen Temperaturen, bei welchen gar keine oder im wesentlichen keine Wärmedenaturierung stattfindet, beispielsweise bei 41°C, geschüttelt wird, tritt eine andere Art von Polymerisation in Erscheinung. Diese Art von Polymerisation wird im folgenden als nicht-kovalente Grenzflächen-Polymerisation bezeichnet werden.

Büro Bremen / Bremen Office:  
Postfach / P. O. Box 107127 813  
Hollerallee 32, D-2800 Bremen 1  
Telephon: (04 21) \* 349071  
Telekopierer / Telecopier: CCITT 2  
Telegr. / Cables: Diagramm Bremen  
Telex: 244958 bopat d

Konten / Accounts Bremen:  
Bremer Bank, Bremen  
(BLZ 290 80010) 100144 900  
Deutsche Bank, Bremen  
(BLZ 290 70050) 111 2002  
Bank für Gemeinwirtschaft, München  
(BLZ 7001011) 17 907 702 00  
FSchA Hamburg  
(BLZ 20010020) 126083-202

Büro München/Munich Office (nur Patentanwälte):  
Postfach / P. O. Box 22 0137  
Schlotthauerstraße 3, D-8000 München 22  
Telephon: (089) 22 33 11  
Telekop. / Telecop.: (089) 22 15 69 CCITT 2  
Telegr. / Cables: Forhopal München  
Telex: 524 282 forho d

Normalerweise werden Insulinpräparate bei Herstellern, in Lagern, Apotheken und bei Patienten bei ungefähr 5°C aufbewahrt. Bei dieser Temperatur scheint in solchen Präparaten keine Grenzflächen-Polymerisation aufzutreten, obwohl solche Präparate beim Transport und bei der Verwendung unweigerlich hin und wieder geschüttelt werden.

In den letzten Jahren sind ständig ansteigende Bemühungen festzustellen, um tragbare oder implantierbare Systeme für die kontinuierliche Infusion von Insulin zu entwickeln. Im wesentlichen umfasst der mechanische Teil solcher Systeme einen Insulinbehälter, ein Pumpsystem und einen geeigneten Katheter für die Abgabe des Insulins an den Patienten. Falls die Insulinlösung mittels einer Spritze verabreicht wird, kann die Spritze selbst die Funktion des Insulinreservoirs übernehmen.

Es ist nun unglücklicherweise festgestellt worden, dass wenn Insulin in kommerziell erhältlichen Lösungen in die obengenannten Abgabesysteme eingefüllt wird, es zu Grenzflächen-Polymerisationerscheinungen schon bei Raumtemperatur kommen kann, wodurch sowohl die mechanischen Teile wie auch der Einleitungskatheter verstopft werden können. Dieses Charakteristikum von Insulinlösungen stellt erwiesenermassen eine grosse Schwierigkeit hinsichtlich weiterer Entwicklungen von klinischen Anwendungen von kontinuierlichen Infusionsausrüstungen dar.



29.10.80

3240177

- 3 -

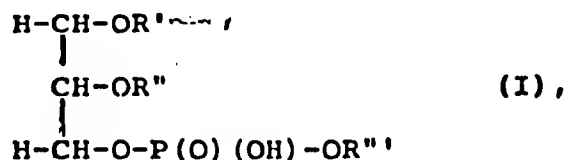
Es ist klar, dass in allen Arten von kontinuierlichen Abgabevorrichtungen die Insulinlösungen bewegt werden, was eben zur genannten Grenzflächen-Polymerisation führen kann. Die allgemeinen Nachteile von Insulinpräparaten gemäss dem Stand der Technik hinsichtlich der genannten Schwierigkeit sind in der Literatur weitgehend dokumentiert, siehe dazu beispielsweise Diabetologia 19, 1980, Seiten 1 bis 9.

Um dieses Problem zu lösen, ist vorgeschlagen worden, saure Insulinlösungen zu verwenden, die Glutaminsäure oder Asparaginsäure enthalten; siehe dazu Diabetes 30, 1981, Seite 83. Insulin ist jedoch in sauren Lösungen chemisch instabil, sogar unterhalb Körpertemperaturen. Ebenso ist vorgeschlagen worden, insulinhaltige Formulierungen zu verwenden, welche nicht-ionische oberflächenaktive Stoffe enthalten, siehe dazu DE-Patentanmeldung Nr. P 2 952 119. Dazu ist aber zu sagen, dass nicht-ionische oberflächenaktive Stoffe in Medikamenten für parenterale Anwendung als unerwünschte Beimischungen betrachtet werden können.

Es ist daher Aufgabe der Erfindung, die oben genannten Nachteile der Insulinpräparationen nach dem Stand der Technik zu vermeiden.

Die Aufgabe wird durch eine stabilisierte Insulinlösung gelöst, die eine physikalisch stabilisierte Insulinlösung, die gegebenenfalls Zink, ein Konservierungsmittel, einen Zusatz, um die Lösung isotonisch zu machen

und eine Puffersubstanz enthält, dadurch gekennzeichnet, dass sie stabilisierende Mengen an einem Phospholipid der Formel (I) enthält



in der R' und R'', die gleich oder verschieden sein können, stehen für Wasserstoff, Alkylcarbonyl, Alkenylcarbonyl, Alkadienylcarbonyl, Alkatrienylcarbonyl oder Alkatetraenylcarbonyl, mit der Massgabe, dass R' und R'' nie gleichzeitig Wasserstoff sind, und in der R''' für eine hydrophile Gruppe steht.

Ein erfindungsgemäßes Verfahren zur Herstellung ist dadurch gekennzeichnet, daß Insulin mit einer Verbindung der Formel (I) gemäß Patentanspruch 1 gemischt wird, wobei ggf. zusätzlich ein Zinksalz, ein Konservierungsmittel, ein Zusatz, um die Lösung isotonisch zu machen und eine Puffersubstanz in Anwesenheit von Wasser zugegeben werden können.

Ein weiteres erfindungsgemäßes Verfahren zur Stabilisierung einer Insulinlösung ist dadurch gekennzeichnet, daß ein Phospholipid der Formel (I) gemäß Patentanspruch 1, bevorzugterweise in einer wässrigen Lösung, welche, falls gewünscht, einer Ultraschallbehandlung unterzogen worden ist, zugegeben wird.

Die Erfindung schafft also neue Präparate von gelöstem Insulin, in denen das Insulin wesentlich weniger zu nicht-kovalenter Grenzflächen-Polymerisation neigt und dies unter Bedingungen, wie sie in Ausrüstungen für kontinuierliche Insulinaßgabe herrschen, als konventionelle Insulinpräparate.

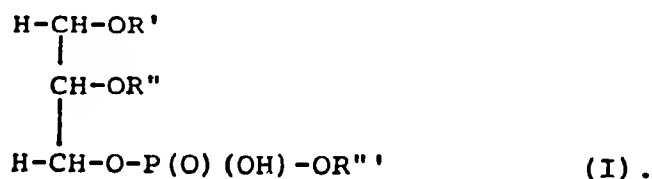
29.10.82

3240177

- 5 -

Es ist überraschenderweise gefunden worden, dass Insulinlösungen stabilisiert werden eben gegen die oben beschriebene Grenzflächen -Polymerisation, wenn mindestens ein Phospholipid in der genannten Lösung vorliegt.

Die Phospholipide, die in den erfindungsgemässen Insulinlösungen vorliegen, entsprechen der folgenden Formel (I)



In der Formel stehen R' und R'', die gleich oder verschieden sein können, je für Wasserstoff, Alkylcarbonyl, Alkenylcarbonyl, Alkadienylcarbonyl, Alkatrienylcarbonyl oder Alkatetraenylcarbonyl mit der Massgabe, dass nie beide, R' und R'', gleichzeitig Wasserstoff sind und R''' steht für eine hydrophile Gruppe. Beispiele solcher hydrophilen Gruppen sind 2-(Trimethylammonium)äthyl, 2-Aminoäthyl, 2-Carboxy-2-aminoäthyl, 2,3-Dihydroxypropyl oder 2,3,4,5,6-Pentahydroxycyclohexyl. Die genannten Gruppen, d.h. Alkylcarbonyl, Alkenylcarbonyl, Alkadienylcarbonyl, Alkatrienylcarbonyl und Alkatetraenylcarbonyl-Gruppen können von etwa 8 bis 22 C-Atome enthalten; in einer bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung enthalten die genannten Gruppen von etwa 12 bis 22 C-Atome.

29.10.88

3240177

- 6 -

Dementsprechend betrifft diese Erfindung eine stabilisierte Insulinlösung, die Wasser, gelöstes Insulin und mindestens eines der Phospholipide von Formel (I) enthält. Gegebenenfalls enthalten die Lösungen ein Zinksalz, ein Konservierungsmittel, einen Zusatz, um die Lösung isotonisch zu machen, eine Puffersubstanz und weitere physiologisch annehmbare Komponenten, die als Additive in Insulinlösungen oder ähnlichen, bekannt sind.

Eine bevorzugte Unterklasse von Verbindungen der Formel (I) sind Verbindungen, in denen R' und R" je für Alkylcarbonyl stehen. Eine weitere, bevorzugte Untergruppe von Verbindungen der Formel (I) sind Verbindungen, in denen R"' für 2-(Trimethylammonium)äthyl steht, wobei solche Verbindungen als Lecithine bekannt sind. Noch eine weitere Bevorzugung liegt vor für Verbindungen der Formel (I), in denen R' und R" je für Alkylcarbonyl mit von ungefähr 8 bis 16 C-Atomen oder mit von ungefähr 12 bis 16 C-Atomen und in denen R"' für 2-(Trimethylammonium)äthyl stehen. Die am meisten bevorzugte Untergruppe der Verbindungen der Formel (I) sind diejenigen Verbindungen, in denen R' und R" je für Octanoyl stehen. Verbindungen der Formel (I), in denen R' und R" je für Octanoyl stehen, werden bevorzugt, weil sie anscheinend keine Liposome bilden und weiter weil sie, speziell bei niedrigeren Konzentrationen, beispielsweise unterhalb etwa 160 µg/ml, anscheinend keine Micellen bilden.

Bevorzugterweise beträgt die Menge an Phospholipid der Formel (I), die nötig ist, um die Insulinlösung zu stabilisieren, etwa 10 bis 200 µg/ml, noch bevorzugter sind Mengen von 10 bis 100 µg/ml, speziell von etwa 25 bis 75 µg/ml und besonders bevorzugt von etwa 30 bis 50 µg/ml der Insulinlösung. Die Konzentration des gelösten Insulins in den Lösungen gemäss dieser Erfindung liegt im Bereich von etwa 5 bis 1'000 internat. Einheiten (I.U.) pro ml oder sogar höher.

Einige der stabilisierten Insulinlösungen, welche gemäss den weiter unten folgenden Beispielen hergestellt werden, können Liposome enthalten. Die genannten Liposome werden aber kaum Insuline eingeschlossen enthalten, da sie sich schon vor der Zugabe von Insulin bilden.

Wenn in den erfindungsgemässen Insulinlösungen Liposome vorliegen, befindet sich das Insulin bevorzugterweise im wesentlichen ausserhalb der Liposomen in der Lösung. Der Ausdruck "im wesentlichen" steht hier für vorzugsweise mehr als 90 %, speziell bevorzugterweise für mehr als 99 % an Insulin, welches ausserhalb der Liposomen vorliegt.

Liposome, welche Insulin eingeschlossen enthalten können, sind gemäss dem Stand der Technik bekannt, siehe dazu beispielsweise die veröffentlichte EP-Anmeldung Nr. 32 622. Diese Liposome können von den erfindungsgemässen einmal nach ihrem Verwendungszweck unterschieden werden, wie auch aufgrund der Tatsache, daß in den Insulinlösungen gemäss der vorliegenden Erfindung Insulin höchstens zufällig innerhalb irgend-

welcher Liposomvesikel vorliegen kann. Während die Insulinlösung gemäß dieser Erfindung für parenterale Verabreichung gedacht sind, liegt die Hauptüberlegung, die zum Einschluss von Insulin in Liposomen geführt hat, in der oralen Verabreichung des Mittels. Ein Zweck des Einschlusses von Insulin in den Liposomen ist es, das Insulin gegen unerwünschten chemischen Angriff zu schützen; beispielsweise gegen die chemische Zersetzung von Insulin im Magen, im Falle von oraler Verabreichung von Insulin. Die Veröffentlichungen betreffend in Liposomen enthaltenem Insulin betreffen in keiner Weise die physikalische Stabilisierung von Insulinlösungen gegen Grenzflächen-Polymerisierung. In bekannten insulinhaltigen Liposomen liegt zudem das Gewichtsverhältnis zwischen dem Phospholipid und dem Insulin beispielsweise zwischen 1:0,01 bis 1:0,001, währenddem in den erfindungsgemässen Lösungen das genannte Gewichtsverhältnis im Bereich zwischen etwa 1:5 und 1:10'000, bevorzugterweise im Bereich zwischen etwa 1:10 bis 1:1'000 liegt.

Die DE-Offenlegungsschrift Nr. 2 652 636 betrifft ein Verfahren zur Stabilisierung von empfindlichen Proteinen mittels Zugabe von Schutzverbindungen mit amphophiler Struktur. Im Gegensatz zur vorliegenden Erfindung wird die Stabilisierung gemäss der genannten DE-Offenlegungsschrift dadurch erreicht, dass das empfindliche Protein schützend umhüllt wird, so dass dessen Kontakt mit dem Wasser verhindert wird. Zudem wird gemäss der Terminologie in der genannten DE-Offenlegungsschrift Insulin

nicht als empfindliches Protein aufgefasst.

Ein Ziel dieser Erfindung ist es, Insulin in Kontakt mit Wasser, d.h. in Lösung, zu halten, und es aber zugleich vor Kontakten mit anderen Grenzflächen zu schützen.

Die Insulinlösungen gemäss dieser Erfindung enthalten vorzugsweise Insulin, das von Rindern, Schweinen oder von Menschen stammt.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die erfindungsgemässe Insulinlösung Zink. Die Menge an zugegebenem Zink sollte aber so ausgewählt werden, dass keine Ausfällung erfolgt. Eine gute Stabilität gegen Grenzflächen-Polymerisierung wird in Insulinlösungen dann erreicht, wenn das Verhältnis zwischen der molaren Konzentration an Zinkionen, die dem Insulin zur Verfügung stehen, und der molaren Konzentration an Insulin, berechnet als Hexameres, im Bereich von etwa 1,5 bis 4,6, bevorzugterweise von etwa 3 bis 4,5, speziell bevorzugterweise von etwa 3,6 bis 4,3 liegt. Bevorzugte Zinksalze sind lösliche Zinksalze wie Zinkacetat oder Zinkchlorid. Wenn die Insulinlösung gemäss dieser Erfindung Verbindungen enthält, die mit Zink Komplexe bilden, wie etwa Aminosäuren, beispielsweise Glycin oder Histidin oder Hydroxycarbonsäuren wie beispielsweise Zitronensäure, steht nur ein Teil der Gesamt-Zinkmenge zur Verfügung des Insulins.

29.10.82

3240177

- 10 -

Eine beispielshafte Methode zur Herstellung der erfindungsgemässen Insulinlösungen umfasst das Auflösen von Insulin, beispielsweise eines kristallinen Zinkinsulin-Komplexes oder ein hochgradig gereinigtes Insulin wie das Monocomponent-Insulin gemäss GB-Patent Nr. 1 285 023 in Wasser in Anwesenheit einer Säure, beispielsweise Salzsäure. Eine wässrige Lösung eines Konservierungsmittels, beispielsweise Phenol, ein Alkylphenol wie Cresol oder Methyl-p-hydroxybenzoat wird getrennt davon zubereitet. Die zweite Lösung kann gegebenenfalls auch einen Zusatz enthalten, der die Lösung isotonisch macht, Beispiele solcher Zusätze sind Natriumchlorid oder Glycerin. Die Lösung des Konservierungsmittels kann zudem noch eine Pufferungssubstanz enthalten wie Natriumorthophosphat, Natriumcitrat, Natriumacetat oder TRIS (tris (Hydroxymethyl)aminomethan). Die derart erhaltene Konservierungslösung wird dann, falls erwünscht, zur sauren Insulinlösung gegeben, worauf dann eine Base zugegeben wird, beispielsweise Natriumhydroxidlösung, um den pH-Wert auf Neutralität zu bringen. Im Gebiete dieser Erfindung steht Neutralität für pH-Werte im Bereich von etwa 6,5 bis 8. Das Phospholipid der Formel (I) kann zur Insulinlösung gegeben werden in Form einer Lösung oder einer kolloidalen Lösung, wie sie erhalten wird mittels Auflösen oder Suspension des Phospholipids der Formel (I) in Wasser und, falls nötig, nach einer Ultraschallbehandlung der Suspension vor dem Zumischen zur Insulinlösung. Die Phospholipidlösung kann, falls



29.10.80

3240177

- 11 -

gewünscht, ebenfalls eine Pufferungssubstanz und ein Konservierungsmittel enthalten. Nach dem Zumischen des Phospholipids kann der pH-Wert des Insulinpräparates wiederum auf Neutralität gebracht werden. Abschließend wird die Insulinlösung mittels Zugabe eines berechneten Wasservolumens auf die gewünschte Konzentration gebracht, worauf es mittels Filtration sterilisiert wird und dann aseptisch in sterile Violen abgefüllt wird, die anschliessend verschweisst werden.

Die vorliegende Erfindung umfasst auch ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemässen Insulinlösungen, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass Insulin mit einer Verbindung der Formel (I) gemischt wird und daß gegebenenfalls weiter ein Zinksalz, ein Konservierungsmittel, ein Zusatz, um die Lösung isotonisch zu machen und eine Pufferungssubstanz in Anwesenheit von Wasser zugegeben werden.

Einige Verbindungen der Formel (I) sind bekannt und die restlichen Verbindungen der Formel (I) können mittels Verfahren hergestellt werden, die analog denjenigen sind, die für die Herstellung der bekannten Verbindungen verwendet werden.

Weitere Details zur Ausführung der vorliegenden Erfindung werden in den folgenden Beispielen gegeben, welche Beispiele jedoch nicht als Begrenzung irgendeiner Art hinsichtlich des Erfindungsumfanges aufzufassen sind. Das Ausgangs-Insulinmaterial,

29.10.80

3240177

- 12 -

welches in den Beispielen verwendet worden ist, enthält etwa 20 bis 35  $\mu\text{g}$  Zink pro mg Stickstoff. Die Bestimmung des Stabilitätsfaktors geschieht gemäss den folgenden Angaben:

Um die Stabilität von Insulinlösungen hinsichtlich der Interface-Polymerisation zu bestimmen, werden die genannten Lösungen einem Stabilitätstest unterzogen, welcher unter Einwirkung von Aussenkräften verläuft und der folgendermassen ausgeführt wird:

Violen von 12,5 ml Inhalt mit je 10 ml Testlösung wurden mit einem Gummistopfen geschlossen. Dann wurden sie vertikal auf einer Schüttelplatte angeordnet (Apparat von HETO, Dänemark), welche total im Wasserbad lag, das bei einer Temperatur von  $41 \pm 0,1^\circ\text{C}$  gehalten wurde. Die Plattform wurde horizontal hin- und herbewegt und zwar mit einer Frequenz von 100 Bewegungen pro Minute und einer Amplitude von 50 mm.

Die Opaleszenz der Testlösungen wurde in regelmässigen Zeitintervallen auf einem "Fischer DRT 1000 Nephelometer" (Apparat von Fischer, Canada) bestimmt. Dabei wurde angenommen, dass Grenzflächen-Polymerisierung dann eintrat, wenn die Trübung mehr als 10 nephelometrischer Trübungseinheiten (NTU) betrug.

29.10.88

3240177

- 13 -

Der Stabilitätsfaktor wurde berechnet als das Verhältnis der Zeiten, in denen die Grenzflächen-Polymerisation bei erfindungsgemässen Testlösungen eintrat zu denjenigen Zeiten, in denen die genannte Erscheinung in Mischungen ohne Verbindungen der Formel (I) eintrat.

#### Beispiel 1

500 g semisynthetisches Humaninsulin wurden in 10 ml einer 0,045 N Salzsäurelösung gelöst. Zur Lösung wurden 359 mg Methyl-p-hydroxybenzoat gegeben, welches in 300 ml destilliertem Wasser gelöst war. Zur Mischung wurden dann 476 mg Natriumacetat-Trihydrat, 2,46 g Natriumchlorid und 4,73 ml einer 0,2 N Natriumhydroxidlösung gegeben, welche zusammen in 15 ml destilliertem Wasser gelöst waren. Dann wurden 9 mg Dimyristoyl,L-alpha-phosphatidylcholin in 10 ml einer Lösung aus 70 mg Natriumchlorid, 13,6 mg Natriumacetat und 10 mg Methyl-p-hydroxybenzoat in destilliertem Wasser suspendiert. Durch die Aufschlammung wurde dann Stickstoff geleitet, welche Aufschlammung dabei 2 Stunden lang einer Ultraschallbehandlung in einem Ultraschallbad unterzogen wurde. Die resultierende kolloidale Lösung wurde unter Rühren zur obigen Insulinlösung gegeben. Der pH der Mischung wurde darauf mittels 0,2 N Salzsäurelösung oder mittels 0,2 N Natriumhydroxidlösung auf 7,45 eingestellt und die Mischung wurde mittels Zugabe von destilliertem Wasser auf ein Totalvolumen von 350 ml gebracht.

29.10.88

3240177

- 14 -

Der Stabilitätsfaktor der so erhaltenen Insulinlösung lag über 125.

#### Beispiel 2

9,65 g Schweine-Insulin wurden in 400 ml einer 0,02 N Salzsäurelösung gelöst. Dazu wurden dann 5,0 g kristallines Phenol und 40 g wasserfreies Glycerin gegeben. Die Mischung wurde dann mittels destilliertem Wasser auf 2200 ml Volumen gebracht. Der pH der Mischung wurde mittels Zugabe von 0,2 N Natriumhydroxid-lösung auf 7,45 gebracht. Dann wurden 125 mg Distearoyl,L-alpha-phosphatidylcholin unter schwachem Erwärmen in 2 ml 96 %-igem Äthanol gelöst und diese Lösung mittels einer Injektionsspritze in 100 ml destilliertes Wasser von 70°C eingespritzt. Das Wasser wurde dabei stark gerührt. Die resultierende trübe Lösung wurde dann einer Ultraschallbehandlung unterzogen und zwar mittels einer Hochenergie-Ultraschallsonde. Die Behandlung dauerte 15 Minuten. Die resultierende, kolloidale Lösung wurde dann zur oben hergestellten Insulinlösung gegeben. Dies geschah unter Rühren, wobei noch destilliertes Wasser bis zu einem Totalvolumen von 2500 ml zugegeben wurde. Der pH-Wert wurde, falls nötig, wieder auf 7,45 eingestellt. Der Stabilitätsfaktor der erhaltenen Lösung lag über 30.

29.10.88

3240177

- 15 -

Beispiele 3 bis 8

Es wurden Insulinlösungen hergestellt und zwar mittels analoger Verfahren wie im Beispiel 1, mit der Massgabe, dass die eingesetzten Phospholipide Lecithine waren, in denen die hydrophoben Reste, d.h. R' und R'', identisch sind und denjenigen entsprechen, die in der folgenden Tabelle I angegeben sind. Auch die entsprechenden Resultate sind in der folgenden Tabelle I zusammengestellt.

Tabelle I

| Bsp. Nr. | R' und R'' | Insulin Species | Stabilitätsfaktor |
|----------|------------|-----------------|-------------------|
| 3        | Myristoyl  | Schweine-       | über 120          |
| 4        | Palmitoyl  | Schweine-       | 104               |
| 5        | Stearoyl   | Schweine-       | über 117          |
| 6        | Lauroyl    | Human-          | über 133          |
| 7        | Myristoyl  | Human-          | über 133          |
| 8        | Palmitoyl  | Human-          | 75                |

29.10.82

3240177

- 16 -

Beispiel 9

Eine Insulinlösung wurde hergestellt mittels eines dem Verfahren aus Beispiel 1 analogen Vorgehens. Das dabei eingesetzte Phospholipid war Eier-Lecithin und das eingesetzte Insulin war Schweine-Insulin. Der Stabilitätsfaktor der Mischung betrug 96.

Beispiele 10 bis 14

Es wurden Insulinlösungen hergestellt gemäss dem Verfahren, wie es im Beispiel 1 beschrieben ist, mit der Massgabe, dass Schweine-Insulin in einer solchen Menge zugegeben wurde, dass die Konzentrationen gemäss der folgenden Tabelle II erhalten wurden. Auch die entsprechenden Stabilitätsresultate sind in der Tabelle II angegeben:

Tabelle II

| Bsp.<br>Nr. | Insulin<br>I.U. /ml | Stabilitäts-<br>faktor |
|-------------|---------------------|------------------------|
| 10          | 20                  | über 120               |
| 11          | 40                  | über 120               |
| 12          | 100                 | 97                     |
| 13          | 200                 | 79                     |
| 14          | 500                 | 53                     |

20.10.88

3240177

- 17 -

Beispiel 15

1,50 g Schweine-Insulin wurden in 6,5 ml einer 0,2 N Salzsäurelösung gegeben. Die Lösung wurde mittels Wasser auf ein Volumen von 50 ml gebracht. Daneben wurden 1,0 g Methyl-p-hydroxybenzoat und 1,78 g Natriumphosphat in 900 ml destilliertem Wasser gelöst; diese zweite Lösung wurde dann zur Insulinlösung gegeben. Der pH der Mischlösung wurde mittels Zugabe von 0,2 N Natriumhydroxidlösung auf 7,45 eingestellt. Eine kolloidale Dimyristoyl,L-alpha-phosphatidylcholin-Lösung, wie sie schon im Beispiel 2 hergestellt worden war, wurde zugegeben und das Ganze wurde dann mittels Zugabe von Wasser auf 1000 ml gebracht. So wurde eine Endkonzentration an Phospholipid von 50 µg/ml erreicht. Der Stabilitätsfaktor der Lösung lag über 30.

Beispiel 16

Eine Insulinlösung wurde hergestellt analog dem Verfahren aus Beispiel 15, jedoch mit der Massgabe, dass die Endkonzentration 20 ml I.U. Insulin pro ml betrug. Der Stabilitätsfaktor betrug über 17.

Beispiel 17

Eine Insulinlösung wurde hergestellt in Analogie des Vorgehens aus dem Beispiel 15, mit der Massgabe, dass die End-Insulinkonzentration 500 I.U. /ml

29.10.82

3240177

- 18 -

und die Endkonzentration an Dimyristoyl,L-alpha-phosphatidylcholin 50 µg/ml betrug. Der Stabilitätsfaktor dieser Lösung war über 30.

#### Beispiele 18 bis 20

Es wurden Insulinlösungen hergestellt in Analogie mit dem Verfahren aus Beispiel 2, mit der Massgabe, dass soviel Dimyristoyl,L-alpha-phosphatidylcholin eingesetzt wurde, um die Endkonzentration gemäss der folgenden Tabelle V zu erreichen. Auch die entsprechenden Stabilitätswerte sind in der Tabelle V zusammengestellt.

Tabelle V

| Bsp. Nr. | Dimyristoyl-Verbindung µg/ml | Stabilitätsfaktor |
|----------|------------------------------|-------------------|
| 18       | 1                            | 1,3               |
| 19       | 10                           | 1,8               |
| 20       | 50                           | über 33           |

#### Beispiel 21

Es wurde Dioctanoyl,L-alpha-phosphatidylcholin in destilliertem Wasser aufgelöst und wurde dann in einer solchen Menge einer Insulinlösung, die in Analogie zu den Angaben im Beispiel 1 erhalten worden war, zugegeben, dass eine Endkonzentration



29.10.83

3240177

- 19 -

von 30 µg/ml erhalten wurde. Der Stabilitätsfaktor war höher als 63.

#### Beispiel 22

3,65 g semisynthetisches Human-Insulin wurden in 100 ml einer 0,02 N Salzsäurelösung gelöst. Zur Lösung wurden dann 2,0 g kristallines Phenol gegeben. Anschliessend wurden der Lösung 16 g wasserfreies Glycerin und 0,3 ml einer Zinkchloridlösung, welche 4 % Zink enthielt, zugegeben. Mit destilliertem Wasser wurde nun auf ein Volumen von 900 ml aufgefüllt. Der pH der Lösung wurde mittels Zugabe von 0,2 N Natriumhydroxid auf 7,45 eingestellt. Dann wurden 50 mg Dioctanoyl,L-alpha-phosphatidylcholin in destilliertem Wasser gelöst und zur ersten Lösung gegeben. Das Ganze wurde nun mittels Zugabe von destilliertem Wasser auf ein Volumen von 1000 ml gebracht. Der Stabilitätsfaktor dieser Lösung betrug 65.

# **This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

**Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.**

**Defects in the images include but are not limited to the items checked:**

- **BLACK BORDERS**
- **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **✓ FADED TEXT OR DRAWING**
- **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- **REFERENCE (S) OR EXHIBIT (S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- **OTHER: \_\_\_\_\_.**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image problem Mailbox.**